

Epstein-Barr ウイルス前早期抗原定量法の確立と臨床的意義

—特に上咽頭癌における有用性について—

金沢大学医学部医学科耳鼻咽喉科学講座 (主任：古川 似教授)

三 輪 泰 子

上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) と Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) の関連性は、患者血清中の抗EBV抗体価上昇や腫瘍組織内EBV核酸の証明などにより確立されている。特にウイルス複製サイクルに発現する早期抗原 (early antigen, EA) や後期蛋白のEBV粒子抗原 (viral capsid antigen, VCA) に対するIgA抗体は発症時すでに上昇しており、疾患特異性も高いことから、病勢のマーカーとして用いられている。しかし腫瘍細胞ではウイルス複製サイクルはしばしば不完全に終わるという報告があり、今回、より早い段階で発現する前早期蛋白Z蛋白、R蛋白に対する患者血清の反応を調べた。*BZLF1*、*BRLF1* 遺伝子発現プラスミドを構築、大腸菌に導入しZ蛋白、R蛋白を精製した。これらを抗原とし、担癌NPC患者、NPC寛解後患者、伝染性単核球症 (infectious mononucleosis, IM) 患者、非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 患者、頭頸部腫瘍患者および健常者血清との反応をウエスタンブロット法、ELISA法にて検討した。担癌NPC患者では全例抗Z蛋白、R蛋白抗体陽性であり、ELISA法での吸光度も他の群と比べ高値を示した。VCA-IgA抗体価と比較しても、抗Z蛋白、R蛋白抗体陽性はNPC特異性が高かった。以上よりNPC患者における抗Z蛋白、R蛋白抗体価測定は病勢の有用な指標となり得ると考えられた。

Key words Epstein-Barr virus, nasopharyngeal carcinoma, *BZLF1*, *BRLF1*

Epstein-Barr ウイルス (Epstein-Barr virus, EBV) は、1964年にEpsteinら¹⁾によりパーキットリンパ腫由来の培養細胞から発見されたヒトヘルペスウイルスであり、伝染性単核球症 (infectious mononucleosis, IM) の病原体である。現在までパーキットリンパ腫および上咽頭癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) との病因論的関連が証明されているほか、ホジキン病、唾液腺癌、胃癌などの悪性疾患との関連が示唆されている。Oldら²⁾が血清学的にEBV保有細胞抽出抗原と上咽頭癌患者血清とのゲル内沈降反応実験を行い、さらにzur Hausenら³⁾が上咽頭癌腫瘍生検材料内にEBVゲノムを証明したことにより、EBVとNPCの関連が確立された。

EBVは咽頭の上皮細胞に初感染し、続いてBリンパ球に感染しBリンパ球を不死化する。潜伏感染したEBVは一部のウイルス遺伝子のみを発現しており、様々な要因によりウイルス複製・増殖サイクルに入るが、この感染様式の変換は*BZLF1* 遺伝子産物であるZ蛋白や*BRLF1* 遺伝子産物であるR蛋白という前早期蛋白の発現により誘導される^{4,5)}。Z蛋白、R蛋白は早期プロモーターの転写調節因子であり、リンパ球ではZ蛋白発現のみでウイルス複製サイクルが誘導され、上皮系細胞ではZ蛋白、R蛋白の共同により誘導されると報告されている^{6,7)}。これらの転写活性化能により早期遺伝子、後期遺伝子の転写が誘導

され早期抗原 (early antigen, EA) やEBV粒子抗原 (viral capsid antigen, VCA) などのウイルス産物が発現する。上咽頭癌患者血清でVCAに対するIgG抗体価高値が高頻度で認められる⁸⁾こと、EAに対するIgG抗体価陽性も認められる⁹⁾ことが報告され、さらにHenleら¹⁰⁾は上咽頭癌患者の多くで血清中のVCA, EA IgA抗体価が高値となることを示した。NPCは臨床的には眼症状、所属リンパ節腫大などで発症することが多く、早期診断は困難であるが、IgA抗体はNPC発生の段階ですでに存在すること、他のEBV関連疾患では上昇しないこと、すなわちNPC特異的であることから診断マーカーに用いられている。ところでCochetら¹¹⁾は上咽頭癌腫瘍生検材料中に*BZLF1* RNA転写産物やZ蛋白を検出した。またMarechalら¹²⁾、Yipら¹³⁾はELISA法を用いNPC患者血清中に抗Z蛋白抗体を検出した。本研究では、上咽頭癌患者やその他のEBV関連、非関連疾患患者、健常者血清とZ蛋白、R蛋白との反応を調べ、その血清学的診断価値につき検討した。

対象および方法

1. Z蛋白、R蛋白の精製

1. プラスミドの構築

プラスミドpGENT-2 (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学講座

平成9年11月28日受付、平成10年1月22日受理

Abbreviations : AP-1, activator protein-1; kbp, kilo-base pair; EA, early antigen; EBV, Epstein-Barr virus; GST, glutathione-S-transferase; IM, infectious mononucleosis; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; NPC, nasopharyngeal carcinoma; PBS, phosphate-buffered saline; PBS-T, phosphate-buffered saline with tween 20; SCC, squamous cell carcinoma; TPA, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate; VCA, viral capsid antigen

佐藤博助教授から分与された) を発現ベクターとして使用し *BZLF1* 遺伝子発現プラスミドを作製した。すなわちベクターのグルタチオンSトランスフェラーゼ (glutathion-S-transferase, GST) 遺伝子に続くマルチクローニングサイトを制限酵素 *EcoRI* で切断し, *BZLF1* 遺伝子のうち2番目以降のアミノ酸をコードする DNA (金沢大学がん研究所腫瘍分子科学講座佐藤博助教授から分与された) を挿入し, ライゲーションキット (宝酒造, 京都) を用いて結合した。得られたプラスミドを大腸菌 *XL1-Blue* 株に取り込ませ, 大腸菌を形質転換した。 *BZLF1* 遺伝子発現プラスミド¹⁴⁾¹⁵⁾ は Dr Manet (Lanoratoire de Biologie Moleculaire, Lyon, France) より分与され, 同様に大腸菌に導入した。

2. 蛋白の精製

形質転換した大腸菌を 37℃一晩培養し, 8000回転/分, 10分間遠心して集菌した。沈殿に 1mM EDTA 加カリウムーリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え超音波で破碎した。遠心し上清を捨て, 沈殿に洗浄液として 4% トリトン X, EDTA 加リン酸緩衝液を加え懸濁した。室温 30 分振盪した後, 遠心にて沈殿を得た。再度洗浄液を加え上清が透明になるまで同様の作業を行った。

後, 沈殿を蒸留水にて洗浄し, 封入体を得, -80℃にて保存した。

II. 血清

金沢大学医学部附属病院耳鼻咽喉科, 石川県立中央病院耳鼻咽喉科, 富山県立中央病院耳鼻咽喉科において加療した NPC を含む頭頸部腫瘍患者血清, IM 患者血清, 非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 患者血清, 健常者血清を対象とした。さらに金沢大学医学部保健学科医学検査学講座谷内江昭宏教授より分与を受けた EBV 関連疾患患者血清についても検討した。NPC 患者 9 例の患者背景を表 1 に示す。治療前が 5 例, 完全寛解後経過観察中が 3 例, 原発である上咽頭には腫瘍を認めないが他に転移のあるものが 1 例であった。臨床病期分類は UICC の TNM 分類¹⁶⁾に従った。

III. Z 蛋白抗血清, R 蛋白抗血清の解析

1. ウエスタンブロット法

Towbin ら¹⁷⁾の方法に準じウエスタンブロット解析を行った。GST-Z 蛋白, GST-R 蛋白は不溶性の封入体で収蔵されており, 2% メルカプトエタノール加 SDS サンプル緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 6.8, 20% グリセリン, 1% SDS, プロモフェノールブ

Table 1. Clinicopathological data of 9 patients with nasopharyngeal carcinoma

Cases	Patient number	Age (year)	Sex	Histological diagnosis	Clinical stage ^{a)}	Therapy (effect)
NPC patients						
before treatment	1	49	M	Undifferentiated carcinoma	T4N2cM0	Radiation + Chemotherapy (PR)
	2	24	F	Poorly differentiated carcinoma	T3N2cM0	Radiation + Chemotherapy (CR)
	3	51	M	Poorly differentiated carcinoma	T4N2cM0	Radiation + Chemotherapy (PR)
	4	54	M	Poorly differentiated carcinoma	T4N0M0	Radiation + Chemotherapy (CR)
	5	69	F	Poorly differentiated carcinoma	T4N2cM0	Radiation + Chemotherapy (CR)
	6	59	M	Poorly differentiated carcinoma	T4N0M0	Radiation + Chemotherapy (meta)
NPC patients						
without recurrence	7	55	M	SCC	T2N2bM0	Radiation (CR)
	8	88	F	SCC	T3N0M0	Radiation (CR)
	9	61	M	Poorly differentiated carcinoma	T1N2cM0	Radiation + Chemotherapy (CR)

NPC, nasopharyngeal carcinoma; M, male; F, female; SCC, squamous cell carcinoma; PR, partial remission; CR, complete remission

a) Clinical stage was determined according to TNM classification by UICC¹⁶⁾. T, tumor factor; N, metastatic lymphnode factor; M, distant metastasis factor.

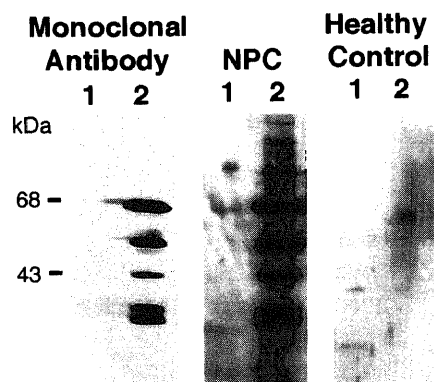


Fig. 1. Western blotting with Z protein. Each membrane was incubated with mouse anti-Z monoclonal antibody or sera. Lane 1, K07 protein as negative control; lane 2, GST-Z protein. The band of 65kDa is a major fraction of GST-Z protein.

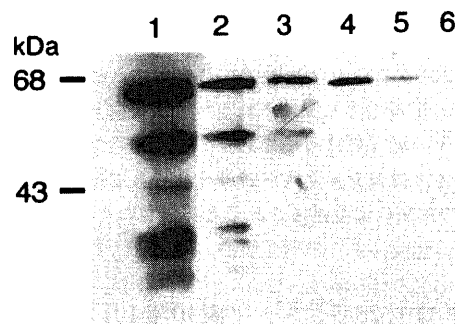


Fig. 2. Reaction of Z protein with diluted sera. To detect the end point titer, a diluted sera was incubated with Z protein. Dilution of sera: lane 1, 1: 30; lane 2, 1: 90; lane 3, 1: 270; lane 4, 1: 810; lane 5, 1: 2430; lane 6, 1: 7290.

ルー)に懸濁し、5分間煮沸し溶解した。Z蛋白、R蛋白それぞれ50 μ gを試料とし、蛋白分子量マーカー高レンジ (Oncogene Research Products, Cambridge, USA) とともに10% SDSポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後ブロッティング装置EPM-8451 (アトー, 東京) を用いてニトロセルロース膜 (Hybond-ECL) (アマシャム, 東京) に転写した。非特異的結合を阻害するためニトロセルロース膜をブロッッキング剤 (ブロックエース) (大日本製薬, 大阪) にて室温1時間処理後、0.05% ツイーン20, 10% ブロックエース加里ン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) にて希釈した患者血清および対照血清と室温一晚反応させた。また陽性コントロールとしてマウス抗Z抗体 (ダコ・ジャパン, 京都) を一次抗体として用いた。0.05% ツイーン20加PBS (PBS with 0.05% Tween20, PBS-T) にて15分3回洗浄し、ブロックエースにて室温1時間処理した後、PBS-Tにて2000倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン抗体 (アマシャム) と室温1時間反応させた。PBS-Tにて15分3回洗浄後、ECLウエスタンブロッティング検出試薬 (アマシャム) にて高感度ケミルミネッセンスフィルム (HYPERFILM-ECL, アマシャム) 上に可視化した。

2. ELISA法

Z蛋白、R蛋白封入体を溶解液に懸濁し、5分間煮沸し溶解した。可溶化した蛋白は、蛋白定量キット (日本バイオラッド, 東京) を使用し、Lowry法¹⁸⁾により定量した。Z蛋白、R蛋白をPBSにて100 μ g/mlに希釈し96穴マイクロタイタープレート (ナルジェヌンク, 東京) に1ウェルあたり100 μ l注入、37℃1時間処理し固相化させた。25% ブロックエース加PBS-Tにて37℃2時間処理した後、第1, 2列には陰性コントロールとしてPBSを、第3列以降には段階的に希釈した患者血清および対照血清を加え、37℃1時間反応させた。PBS-Tにて3回洗浄後、第1列には陰性コントロールとしてPBSを、第2列以降にはPBS-Tにて4000倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン抗体を加え、37℃1時間反応させた。洗浄後、発色基質を加え、1N硫酸にて反応を止め450nmにおける吸光度を測定した。

IV. 統計学的処理

ELISAにおける吸光度は、 $\bar{x} \pm SD$ をもって表した。各群間の平均値の差の検定には分散分析 (Fisher's PLSD法) を用い、有意水準を5%とした。

成 績

I. Z蛋白抗血清測定

1. ウエスタンブロット法

大腸菌蛋白合成系を利用し精製したGST-Z蛋白を抗原とし、患者、健常者血清との反応を調べた (図1)。陽性コントロールとして使用したマウス抗Zモノクローナル抗体で認識されたバンドパターンと同じバンドを示すものを陽性とした。GSTは27kDa、Z蛋白は38kDaであり、GST-Z蛋白は65kDaとなるが、この主バンドの他に、Z蛋白は不安定であるため崩壊した小さな蛋白を認識したバンドが出現している。結果を表2に示す。担癌NPC患者血清では6例全例にバンドの出現を認めたが、寛解後経過観察中のNPC患者血清では3例中1例 (33%) ののみ

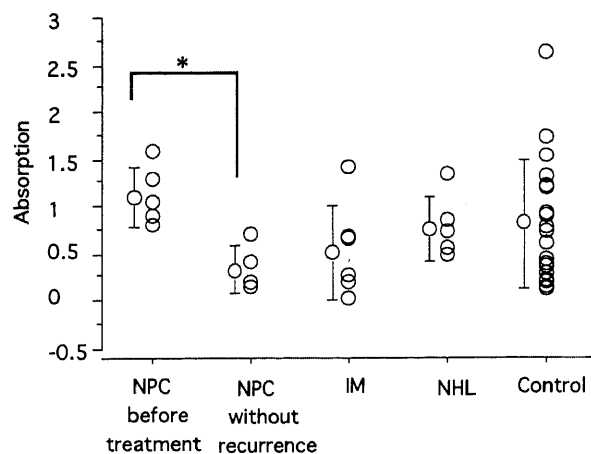


Fig. 3. ELISA analysis with Z protein. The each absorption at 450nm and the $\bar{x} \pm SD$ were shown. * $p < 0.05$ between the groups by Fisher's PLSD test.

Table 2. Detection of anti-Z, -R sera from patients in different pathologies

Examined cases	Number of patients examined	Number (%) of detection-positive patients	
		Anti-Z antibodies	Anti-R antibodies
NPC before treatment	6	6 (100)	6 (100)
NPC without recurrence	3	1 (33)	1 (33)
IM	6	0 (0)	0 (0)
NHL	5	0 (0)	1 (20)
Neck lymphnode metastasis	2	1 (50)	1 (50)
Head and neck cancer	13	2 (15)	2 (15)
Hemophagocytic lymphohistiocytosis	2	0 (0)	0 (0)
CML	2	1 (50)	1 (50)
Lymphohma with chronic active EBV	2	2 (100)	1 (50)
LGL	1	1 (100)	1 (100)
Leukemia	1	1 (100)	1 (100)
Healthy control	5	0 (0)	0 (0)

NPC, nasopharyngeal carcinoma; IM, infectious mononucleosis; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; CML, chronic myelocytic leukemia; EBV, Epstein-Barr virus; LGL, lymphoproliferative disease of granular lymphocyte.

バンドを認めた。IM, NHL患者血清ではZ蛋白のバンドは確認されなかった。頭頸部腫瘍患者では、鼻腔腫瘍1例と喉頭癌1例でバンドを認めた。健常者ではバンドは認めなかった。

陽性例はさらに血清を段階希釈したものを反応させ、バンドが確認できる限界の濃度を調べた(図2)。NPC患者ではその他の疾患でのZ抗血清陽性例より低濃度までバンドが確認可能であった(表3)。

2. ELISA法

患者各群の吸光度を図3に示す。各群の吸光度及び $\bar{x} \pm SD$ で表した。NPCにおいて、担癌状態の患者は寛解後の患者に

比べ吸光度の平均は有意に高値を示した。IM群, NHL群, 頭頸部腫瘍患者と健常者からなるコントロール群とは有意差は認めないものの、担癌NPC患者は高い吸光度を示す傾向があった。

II. R蛋白抗血清測定

1. ウエスタンブロット法

Z蛋白抗血清解析と同様に、大腸菌にて合成したGST-R蛋白を抗原とし、患者、健常者血清との反応を調べた。R蛋白に対するモノクローナル抗体はなく、判定は蛋白分子量によった。R蛋白は94kDaであり、GST-R蛋白は121kDaとなる。担癌

Table 3. Detection of anti-Z and -R antibody titers

Patient number	Diagnosis	Antibody titers ^{a)}	
		Z	R
1	NPC before treatment	1 : 810	1 : 270
2	NPC before treatment	1 : 2430	1 : 2430
3	NPC before treatment	1 : 2000	1 : 2000
4	NPC before treatment	1 : 400	1 : 200
5	NPC before treatment	1 : 1600	1 : 800
6	NPC before treatment	1 : 270	1 : 270
7	NPC without recurrence	< 1 : 10	< 1 : 10
8	NPC without recurrence	< 1 : 10	< 1 : 10
9	NPC without recurrence	1 : 2430	1 : 810
10	NHL	< 1 : 10	1 : 30
11	Neck lymphnode metastasis	1 : 30	1 : 30
12	Nasal undifferentiated carcinoma	1 : 30	1 : 30
13	Laryngeal SCC	1 : 30	1 : 30
14	CML	1 : 30	1 : 30
15	T lymphoma with chronic active EBV	1 : 270	< 1 : 10
16	NK lymphoma with chronic active EBV	1 : 7290	1 : 7290
17	LGL	1 : 90	1 : 90
18	NK leukemia	1 : 30	1 : 30

NPC, nasopharyngeal carcinoma; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; SCC, squamous cell carcinoma; CML, chronic myelocytic leukemia; EBV, Epstein-Barr virus; LGL, lymphoproliferative disease of granular lymphocyte.

a) Antibody titers were represented by the antisera end point dilution with Z or R band recognized in western blotting.

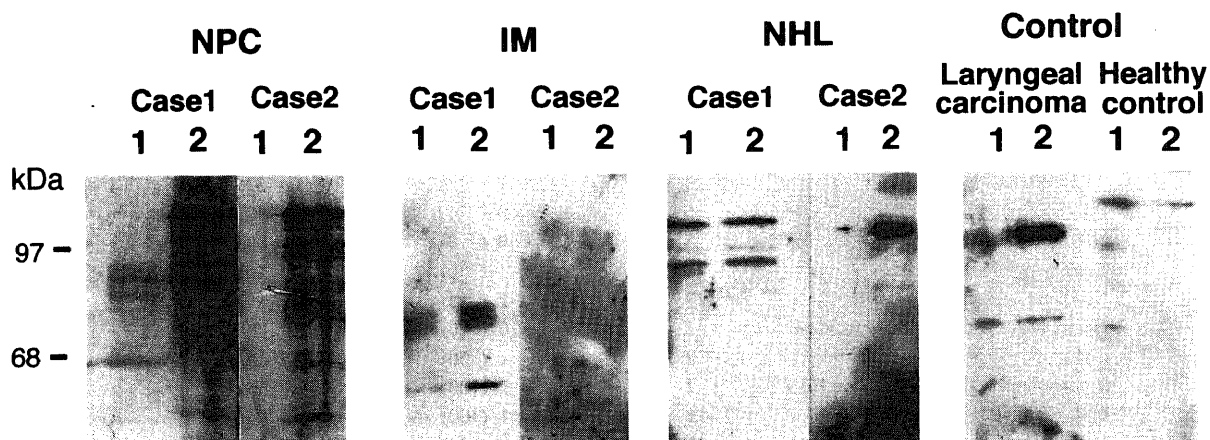


Fig. 4. Western blotting with R protein. R protein and K07 protein were blotted on a membrane. Each membrane was incubated with sera from NPC patients, IM patients, NHL patients, or controls (patients with head and neck cancer and healthy control). Lane 1, K07 protein as negative control; lane 2, GST-R protein. The 121kDa band of lane 2 recognized in NPC patients is a major fraction of GST-R protein. Broken proteins are recognized as bands of smaller sizes.

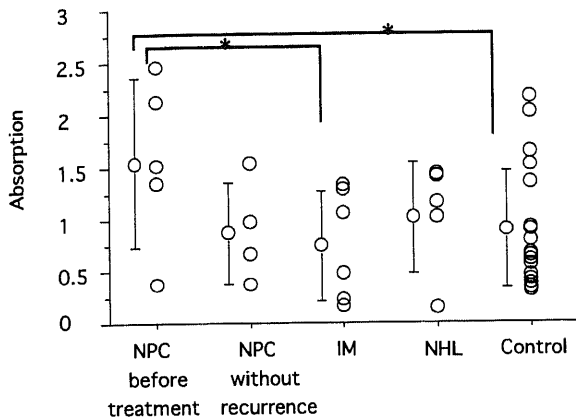


Fig. 5. ELISA analysis with R protein. The each absorption at 450nm and the $\bar{x} \pm SD$ were shown. * $p < 0.05$ between the groups by Fisher's PLSD test.

NPC患者では陰性コントロールとして使用したK07蛋白では認められない、R蛋白特異的な121kDaのバンドを認めた(図4)。この場合も主バンドの他に崩壊した蛋白に対応すると考えられる分子量の小さなバンドが多数出現した。IM患者、NHL患者、コントロール群ではK07蛋白とR蛋白をともに認識するバンドの出現は認めたが、R蛋白特異的な121kDaのバンドは認めなかった。結果は表2に示す。担癌NPC患者6例、経過観察中1例でR蛋白と考えられるバンドを認めた。頭頸部腫瘍患者では、鼻腔腫瘍1例と喉頭癌1例で同様のバンドを認めた。これらの症例は全例Z蛋白抗血清陽性であった。またZ蛋白との反応を認めなかったNHL患者1例でR蛋白と考えられるバンドが確認された。健常者血清ではバンドを認めなかった。

R蛋白についても、陽性例では血清を段階希釈しバンドが確認できる限界の濃度を調べたところ、担癌NPC患者では他の群の陽性例より低濃度までバンドを認めた(表3)。

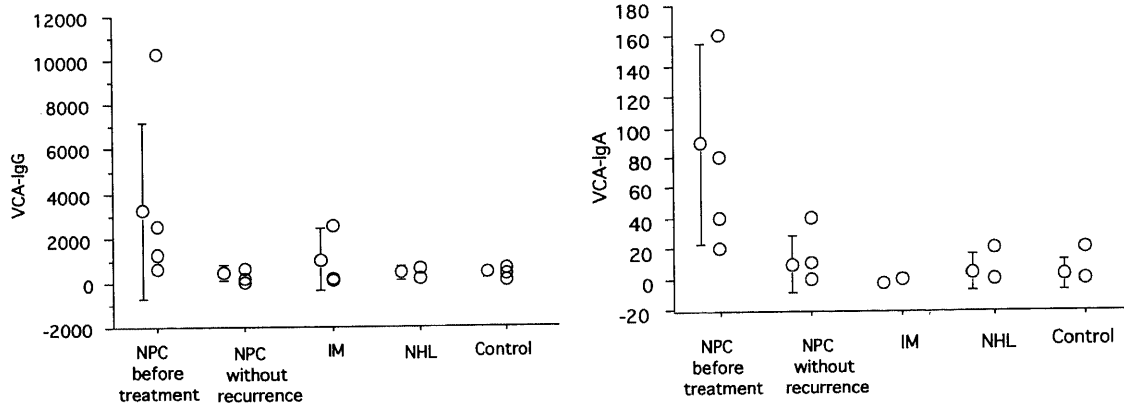


Fig. 6. Anti-VCA-IgA/-IgG antibody titer of patients. The each antibody titer and the $\bar{x} \pm SD$ were shown.

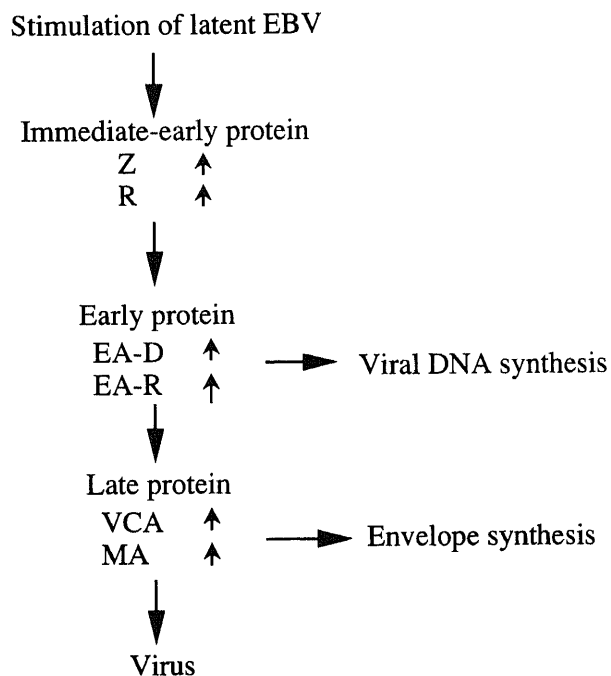


Fig. 7. Schematic representation of EBV productive cycle pathway.

2. ELISA法

患者各群の吸光度を図5に示す。担癌NPC患者群はIM群、コントロール群に比べ有意に高い平均値を示した。またNPC経過観察群やNHL群とは有意差は認めないものの、これらの群より高値を示す傾向にあった。

Ⅲ. 抗VCA抗体価測定

NPC患者、IM患者、NHL患者、原発不明頸部リンパ節転移患者では試料とした血清でVCA-IgA、VCA-IgGを測定しており、図6に示す。担癌NPC患者では他群に比べ抗体価は高値を示していた。

考 察

de Schryverら¹⁹⁾やHenleら²⁰⁾は、間接蛍光抗体法によりNPC患者ではVCA-IgGが存在ししばしば高値をとること、EA-IgGもともに高値をとることが多いと報告しており、その後Henleら²¹⁾は、抗VCA抗体価、抗EA抗体価は腫瘍量と関連しており、治療前の腫瘍量が多いほど抗体価も高値を示し、さらに治療後数年経過すると抗VCA抗体価は著明に減少し、抗EA抗体は検出されなくなったと報告している。またWaraら²²⁾によるとNPC患者では血清IgAレベルが上昇し、Henleら¹⁰⁾はNPC患者血清においてVCA-IgA、EA-IgAが高値となると報告した。IgA高値となる原因は不明であるが、IgAがEBVと結合すると上皮細胞のIgA輸送機構により感染が促進されるという報告がある²³⁾。VCA-IgA、EA-IgAは発症時すでに存在しており、この上昇は他のEBV関連疾患では認めにくくNPC特異性が高いこと、寛解後は低値をとるが臨床的再発より早期に抗体価上昇を認めることがあるなどの理由から、臨床的にNPCの病勢の指標として用いられている²⁴⁾。今回検討を加えた症例についてもこれまでの報告と同様に、VCA-IgA、EA-IgAは担癌NPC患者で高値を示し、寛解後の患者では低値となっていた。またその他の疾患では陰性またはごく軽度の上昇を示していた。

EBVは咽頭上皮に初感染した後、Bリンパ球に感染し潜伏感染の状態となる。EBV感染Bリンパ球では、試験管内ではテトラデカノイルホルボールアセテート (12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)²⁵⁾²⁶⁾や免疫グロブリンの架橋²⁷⁾などの刺激によりウイルス複製サイクルに入ることが知られている。この潜伏感染からウイルス複製サイクルへの移行はZ蛋白やR蛋白の発現が引き金となる⁴⁾⁵⁾²⁸⁾。Z蛋白は制限酵素BamHI断片Z左向き読み取り枠1番目であるBZLF1遺伝子にコードされる38kDaのウイルス性転写調節因子であり、同種二量体を形成してDNAに結合する。R蛋白はBRLF1遺伝子にコードされる96kDaのウイルス性転写調節因子である。これらの蛋白は前早期プロモーターにより誘導される。そのうちZプロモーターは1キロ塩基対(kilo base pairs, kbp)のメッセージを転写するが、これはZ蛋白のみを誘導し、RプロモーターはZ蛋白とR蛋白を誘導する2.8kbpのメッセージを転写する¹⁰⁾。またいずれのプロモーターもZ蛋白応答配列を含み、Z蛋白は自己プロモーターを活性化するのみならずRプロモーターからの転写を活性化することによりR蛋白も誘導する²⁹⁾³⁰⁾。TPAや免疫グロブリンの刺激を受けるとプロテインキナーゼCが活性化され、このシグナルは細胞性転写因子である活性化蛋白-1 (activator protein-1, AP-1)を活性化する。さらにAP-1がZプロモーターにあるTPA応答配列を介してBZLF1遺伝子の発現を活性化する。これが自分自

身のZプロモーターおよびRプロモーターを活性化し、Z蛋白およびR蛋白が誘導される³¹⁾³²⁾。感染様式の変換は細胞系により異なり、ウイルス複製サイクルでの複製開始点であるoriLytを活性化するのはZ蛋白のみとされ³³⁾リンパ球系ではZ蛋白はそれ単独でウイルスを潜伏感染状態から複製サイクルへと移行させることができるが、上皮系細胞ではR蛋白によるZプロモーター活性促進も重要である⁷⁾。これら2つの前早期蛋白が相乗的に働いて早期蛋白のプロモーターを活性化し、EAなどの早期蛋白発現が誘導され、続いてVCAなどの後期蛋白発現が誘導されて²⁷⁾ウイルス粒子が産生される(図7)。本研究においては、EA、VCAに対して臨床で日常的に行われている如く、Z蛋白、R蛋白の発現量をそれらに対する血清抗体価を測定することにより評価した。ウエスタンブロット法の結果から、担癌NPC患者では全例抗Z蛋白抗体陽性であり、高い希釈倍率でも検出し得、抗体価の上昇を認めた。これに比べ、寛解後経過観察中のNPC患者では抗Z蛋白抗体陽性は3例中1例(33%)にとどまった。またEBV関連疾患であるIM患者血清では全例で抗Z蛋白抗体を認めず、その他の頭頸部癌患者や健常者によるコントロール群でも陽性例は13例中2例(15%)のみであった。IM患者では、咽頭上皮に初感染したEBVがBリンパ球に感染しこれを不死化しており、この不死化Bリンパ球に対する細胞障害性Tリンパ球の免疫反応が症状を引き起こしている。今回IM患者で抗Z蛋白抗体を認めなかった理由として、Tリンパ球により不死化Bリンパ球が速やかに排除され、抗Z蛋白抗体上昇を引き起こすほどの抗原提示がなかった可能性がある。コントロール群での陽性例については、非EBV関連疾患患者や健常者の数%でVCA-IgA陽性との報告²⁴⁾があり、EBV関連疾患に限らず多少のウイルス複製サイクルは起きていると考えられる³⁴⁾。頭頸部癌患者での陽性例のうち1例は喉頭癌患者であるが、3年前に胃癌のため胃切除を受けており、胃癌とEBVとの関連もあり得る。原発不明頸部リンパ節転移患者2例のうち1例でZ蛋白抗血清陽性であったが、上咽頭所見は問題なく生検でも腫瘍は発見されなかった。これらの患者では宿主の免疫能低下によるウイルス再活性化を反映している可能性があるが、抗体価はNPC患者のそれと比べ軽微な上昇のみであった。R蛋白抗血清陽性例は抗Z蛋白抗体陽性例とほぼ一致し、担癌NPC患者ではやはり高値をとる傾向があった。NHL患者1例で抗Z蛋白抗体陰性、R蛋白抗血清陽性であった。ELISA法による検討では、Z蛋白の場合、NPC担癌状態と寛解後では吸光度に有意差を認め、また担癌NPC患者をIM患者やNHL患者、頭頸部腫瘍患者と健常者から成るコントロール群と比較すると、有意差はないものの高値をとる傾向があった。R蛋白の場合も担癌NPC患者は他の群より高値をとる傾向がみられ、IM群、コントロール群とは有意差を認めた。以上よりZ蛋白、R蛋白に対するNPC患者血清の反応は病勢を反映すると示唆される。そこで抗VCA抗体価と比較したところ、NPC患者でVCA-IgGが陰性とされる640倍未満の例でも抗Z蛋白、R蛋白抗体が検出された。さらに抗Z蛋白、R蛋白抗体陽性例で抗VCA抗体が測定されていたものでは全例VCA-IgA陽性であったが、VCA-IgA陽性となっていたNHL患者では抗Z蛋白、R蛋白抗体は認められなかった。よってNPCに対する特異性は抗Z蛋白、R蛋白抗体の検出のほうがVCA-IgAよりも高い可能性があるといえる。この理由として次のような説明が考えられる。VCA、EAに対する抗体価は腫瘍内で散発的に複製サイクルに

入った腫瘍細胞数を反映するとされるのに対し、Z蛋白はTPA応答配列を介して細胞性因子を転写活性化するほか、p53蛋白依存性の転写活性化を抑制したり、細胞性NF- κ Bを不活化するなど細胞因子との相互作用が認められている³⁵⁾³⁶⁾。またR蛋白は網膜芽細胞腫 (retinoblastoma) 蛋白と結合し細胞転写因子E2Fを遊離させることにより細胞周期に影響を及ぼす。すなわちZ蛋白、R蛋白の発現が種々の細胞性因子の発現に影響を及ぼし、細胞の機能が阻害され腫瘍形成に関与するのではないかと考えられる。またウイルスが複製サイクルにはいると、最終的に宿主細胞は崩壊することになるはずであるが、NPCなどの腫瘍細胞が消失しないのはウイルスの複製サイクルが完結されないうで終了しているためであるという可能性がある。実際にZ蛋白の発現が必ずしも早期、後期蛋白を誘導しないといわれており、Martel-Renoir³⁷⁾は、NPC生検標本でのEBV複製サイクル遺伝子発現パターンが細胞により様々であったことから、NPCではEBV複製サイクルはしばしば不完全に終わると結論している。従って発癌との関与の可能性の高いZ蛋白、R蛋白といった前早期蛋白の発現は、しばしば誘導されずに終わる早期、後期蛋白の発現より鋭敏にNPCの病勢を反映すると考えられる。ところでNPC患者におけるZ-IgGを測定したYip¹³⁾は、治療前の抗体価による群別では生存率に差を認めなかったが、治療後の抗体価の高低により長期生存率に有意差を認め、また遠隔転移を起こした例では抗体価は再上昇したと報告しており、抗Z蛋白抗体価測定は治療後のNPC患者の予後因子としての有用性を強調している。今回検討した経過観察中のNPC患者では抗Z蛋白、R蛋白抗体陰性例もあれば高い抗体価を示す例もあり、今後の経過に関心が持たれる。

コントロール群のうちELISA法で高い吸光度を示す患者は、ウエスタンブロット法ではZ蛋白と異なるパターンのバンドを多く認めており、抗原蛋白の精製に課題が残ると考えられた。ELISA法は簡便であり患者のスクリーニングに適しているが、結果を吸光度で検出するため上記のような理由により特異性が低くなる可能性がある。ウエスタンブロット法はバンドパターンで確認できるため特異性は高いが、サンプル数が多い場合解析に時間を要する。今回これらの組み合わせにより、NPCにおいてZ蛋白、R蛋白に対する抗体価測定の有用性が認められた。今後症例数を増やし、さらに同一患者の長期経過観察を行い抗体価の変動と臨床像との比較を行うことにより、診断的価値に加え予後判定因子としての価値を検討する必要がある。また抗VCA、EA抗体ではIgGとIgAでの感度の差が研究されており、今回はZ蛋白、R蛋白に対するヒト免疫グロブリンを一括して測定しNPCに対する有用性を認めたが、今後これらの蛋白についてもIgG、IgAを個別に測定しその感度について比較すべきであると思われる。

結 論

EBV BZLF1, BRLF1遺伝子発現プラスミドを大腸菌に導入し、Z蛋白、R蛋白を精製した。これを用いて上咽頭癌患者血清、IM患者血清、NHL患者血清、頭頸部腫瘍患者血清、健康者血清においてZ蛋白、R蛋白に対する抗体価をウエスタンブロット法、ELISA法で調べ、以下の結論を得た。

1. 担癌NPC患者全例においてZ蛋白に対する反応を認め、寛解後の患者との間に有意差を認めた。IM患者、NHL患者、頭頸部腫瘍患者や健康者からなるコントロール群に比べても有

意差はないものの高い反応を示した。

2. 担癌NPC患者全例においてR蛋白に対する反応を認め、コントロール群との間に有意差を認めた。寛解後の患者、IM患者、NHL患者に比べても有意差はないが高い反応を示した。

3. Z蛋白、R蛋白を検出できる血清最終濃度を測定したところ、担癌NPC患者では低濃度でも検出可能であり、抗体価の高度上昇を認めた。その他の疾患患者では抗体価上昇は軽微であった。

4. 抗VCA抗体価と比較すると、VCA-IgG陰性担癌NPC患者で抗Z蛋白、R蛋白抗体が検出された。VCA-IgA陽性NHL患者血清で抗Z蛋白、R蛋白抗体は検出されなかった。このことから抗Z蛋白、R蛋白抗体価上昇のNPC特異性が認められた。

以上より、Z蛋白、R蛋白に対するNPC患者血清の反応は病勢に対する有用な指標となる可能性があるとし唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師古川仰教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始、直接御指導、御協力を賜りました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学講座吉崎智一講師、竹下 元助手に深謝いたします。また貴重な御助言、御協力を賜りました金沢大学がん研究所腫瘍分子科学講座佐藤博助教授、貴重な血清を提供して頂きました金沢大学医学部保健学科医学検査学講座谷内江昭宏教授、および御協力頂きました金沢大学医学部臨床検査学講座橋本琢磨教授、検査技官の皆様へ深く感謝いたします。最後に本研究の遂行に際し御協力を頂きました金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室の皆様へ厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1: 702-703, 1964
- 2) Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF, Harven E, Geering G, Williamson B, Clifford P. Precipitating antibody in human serum to antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 1699-1704, 1966
- 3) zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228: 1056-1058, 1970
- 4) Blanco MA, Cullen BR. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science* 254: 815-820, 1991
- 5) Miller G. The switch between latency and replication of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 161: 833-844, 1990
- 6) Cox MA, Leahy J, Hardwick JM. An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J Virol* 64: 313-321, 1990
- 7) Zalani S, Holly-Guthrie EA, Kenny S. Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9194-9199, 1996
- 8) Kawamura AJr, Takada M, Gotoh A, Hamajima T, Sanpe T, Murata M, Ito Y, Takahashi T, Yoshida T, Tu S, Liu C, Yang C, Wang C. Seroepidemiological studies on nasopharyngeal carcinoma by fluorescent antibody techniques with cultured Burkitt lymphoma cell. *Jpn J Cancer Res* 61: 55-71, 1970
- 9) Ida S, Sairenji T, Hinuma Y. Antibody to a new antigen induced by Epstein-Barr virus in patients with nasopharyngeal

carcinoma, leukemia, malignant lymphoma and in control groups. *Jpn J Cancer Res* 63: 49-55, 1972

10) Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 17: 1-7, 1976

11) Cochet C, Martel-Renoir D, Grunewald V, Bosq J, Cochet G, Schwaab G, Bernaudin JF, Joab I. Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene, BZLF-1 in nasopharyngeal carcinoma tumour cells. *Virology* 197: 358-365, 1993

12) Marechal V, Meyohas MC, Joab I, Gaha S, Giot JF, Sergeant A, Nicolas JC. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to ZEBRA, an Epstein-Barr trans-activator. *Res Virol* 144: 397-404, 1993

13) Yip TT, Ngan RK, Lau WH, Poon YF, Joab I, Cochet C, Cheng AK. A possible prognostic role of Immunoglobulin-G antibody against recombinant Epstein-Barr virus BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 74: 2414-2424, 1994

14) Manet E, Gruffat H, Biemont MC, Moreno N, Chambard P, Giot JF, Sergeant A. Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional transactivators. *EMBO J* 8: 1819-1826, 1989

15) Gruffat H, Sergeant A. Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res* 22: 1172-1178, 1994

16) UICC. Pharynx. In P Hermanek, LH Sobin (eds.), TNM classification of malignant tumours, 4th ed, p19-22, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1987

17) Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354, 1979

18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 193: 265-275, 1951

19) de Schryver A, Friberg S Jr, Klein G, Henle W, Henle G, de The G, Clifford P, Ho HC. Epstein-Barr virus-associated antibody patterns in carcinoma of the post-nasal space. *Clin Exp Immunol* 5: 443-459, 1969

20) Henle W, Henle G, Zajac BA, Peason G, Waubke R, Scriba M. Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science* 169: 188-190, 1970

21) Henle W, Ho HC, Henle G, Kwan HC. Antibodies to Epstein-Barr virus-related antigen in nasopharyngeal carcinomas. Comparison of active cases and long-term survivors. *J Nat Cancer Inst* 51: 361-369, 1973

22) Wara WM, Wara DW, Phillips TL, Ammann AJ. Elevated IgA in carcinoma of the nasopharynx. *Cancer* 35: 1313-1315, 1975

23) Sixbey JW, Yao QY. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* 255: 1578-1580, 1992

24) Peason GR, Weiland LH, Neel HB, Taylor W, Earle J,

Mulroney SE, Goepfert H, Lanier A, Talvot ML, Pilch B, Goodman M, Huang A, Levine PH, Hyams V, Moran E, Henle G, Henle W. Application of Epstein-Barr virus (EBV) serology to the diagnosis of North American nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 51: 260-268, 1983

25) zur Hausen H, O'Neill FJ, Freese UK, Hecker E. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumor promoter TPA. *Nature (London)* 272: 373-375, 1978

26) Flemington E, Speck SH. Identification of phorbol ester response elements in the promoter of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* 64: 1217-1226, 1990

27) Takada K, Ono Y. Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J Virol* 63: 445-449, 1989

28) Countryman J, Miller G. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4085-4089, 1985

29) Flemington E, Speck SH. Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *J Virol* 64: 1227-1232, 1990

30) Flemington EK, Lytle JP, Cayrol C, Borrás AM, Speck SH. DNA-binding-defective mutants of the Epstein-Barr virus lytic switch activator Zta transactivate with altered specificities. *Mol Cell Biol* 14: 3041-3052, 1994

31) Zalani S, Holley-Guthrie EA, Gutsch DE, Kenny S. The Epstein-Barr virus immediate-early promoter BRLF1 can be activated by the cellular Sp1 transcription factor. *J Virol* 66: 7282-7292, 1992

32) Zalani S, Holley-Guthrie EA, Kenny S. The Zif268 cellular transcription factor activates expression of the Epstein-Barr virus immediate-early BRLF1 promoter. *J Virol* 69: 3816-3823, 1995

33) Schepers A, Pich D, Hammerschmidt W. A transcription factor with homology to the AP-1 family links RNA transcription and DNA replication in the lytic cycle of Epstein-Barr virus. *EMBO J* 12: 3921-3929, 1993

34) Gonnella R, Angeloni A, Calogero A, Farina A, Santarelli R, Gentile G, Arcese W, Martino P, Mandelli F, Frati L, Faggioni A, Ragona G. Transcription of latent and replicative Epstein-Barr Virus genes in bone-marrow and peripheral-blood mononuclear cells of healthy donors. *Int J Cancer* 70: 524-529, 1997

35) Zang Q, Gutsch D, Kenney S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: Implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 14: 1929-1938, 1994

36) Gusch DE, Holly-Guthrie EA, Zhang Q, Stein B, Blonar MA, Baldwin AS, Kenney S. The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF- κ B. *Mol Cell Biol* 14: 1939-1948, 1994

37) Martel-Renoir D, Grunewald V, Touitou R, Schwaab G, Joab I. Qualitative analysis of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J Gen Virol* 76: 1401-1408, 1995

Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Immediate-early Proteins and Evaluation of its Clinical Role especially in Nasopharyngeal Carcinoma Hiroko Miwa, Department of Otolaryngology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Jusen Med Soc., **107**, 55 — 63 (1998)

Key words nasopharyngeal carcinoma, Epstein-Barr virus, BZLF1, BRLF1

Abstract

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) was found to be associated with Epstein-Barr virus (EBV) by serologic evidence, and the relationship was confirmed by the detection of EBV DNA and EB-encoded RNAs in NPC cells. Elevation of IgG and IgA antibodies against EBV viral capsid antigen and early antigen are often found in NPC patients. Serologic tests of these antibodies have been recognized as tumor markers for NPC. EBV persists in a latent form in both epithelial cells and B lymphocytes. A variety of stimulation may activate a virus. The Z protein and the R protein, which are immediate-early proteins of the EBV lytic cycle, control the switch of the virus from a latent to a lytic cycle by transactivating several early promoters. But a lytic cycle is sometimes incomplete in a tumor. Z protein and R protein are expressed earlier than EA or VCA, so anti-Z, -R antibody titers will be more sensitive markers for NPC. Plasmids presenting *BZLF1* or *BRLF1* gene were produced, and Z proteins and R proteins were harvested. Sera from patients with NPC, infectious mononucleosis (IM), non-Hodgkin's lymphoma (NHL), head and neck carcinoma and healthy controls are examined for its reactivity against Z and R protein by Western blotting and ELISA. NPC patients before treatment all indicated high anti-Z, -R antibody titers, whereas in three NPC patients without recurrence, only one (33%) was positive. IM patients all indicated no anti-Z, -R antibodies. Several patients of other diseases have anti-Z, -R antibodies, but their titers were low. In comparison with anti-VCA antibodies, anti-Z, -R antibodies were specific to NPC. A NPC patient whose anti-VCA antibodies were negative indicated high anti-Z, -R antibody titers, and a NHL patient who showed elevation of anti-VCA antibody titer was anti-Z, -R antibodies negative. These findings suggest that the anti-Z, -R antibody titers are useful markers for NPC.